

Evaluación de la toxicidad de sedimento y agua de mar contaminados por el vertido de fuel del *Prestige*, mediante el uso de bioensayos con las almejas *Venerupis pullastra*, *Tappes decussatus* y *Venerupis rhomboideus* y la microalga *Skeletonema costatum*

Assessment of the toxicity of sediment and seawater polluted by the *Prestige* fuel spill using bioassays with clams (*Venerupis pullastra*, *Tappes decussatus* and *Venerupis rhomboideus*) and the microalga *Skeletonema costatum*

J.C. Mariño-Balsa*

P. Pérez

P. Estévez-Blanco

L. Saco-Álvarez

E. Fernández

R. Beiras

Laboratorio de Ecoloxía Mariña (LEM)

Facultad de Ciencias

Universidad de Vigo

Vigo E36200, Galicia, España

*E-mail: mai@uvigo.es

Recibida en enero de 2003; aceptada en febrero de 2003

Resumen

En este estudio presentamos los primeros resultados obtenidos del control de la contaminación producida por el accidente del petrolero *Prestige* en la costa de Galicia. Para evaluar la toxicidad del agua y el sedimento expuestos al fuel, se realizaron tres tipos de bioensayos: usando almejas juveniles, embriones de almeja y una microalga. En los primeros, se evaluó el comportamiento de enterramiento de *Venerupis pullastra* y *Tappes decussatus* durante las primeras 24 h, en dos muestras de sedimento procedentes de dos playas expuestas, una de ellas contaminada por fuel y la otra aparentemente limpia. No se encontraron diferencias significativas entre los dos tipos de sedimento. En segundo lugar se estudió el éxito en la embriogénesis de *Venerupis rhomboideus* después de la incubación en agua de mar y lixiviados de sedimento recogidos en las zonas afectadas. En este caso, el agua contaminada con fuel mostró una marcada inhibición de la embriogénesis, siendo moderada en los lixiviados. Al mismo tiempo se realizaron bioensayos, también con agua y sedimento de estas mismas zonas, con la diatomea *Skeletonema costatum*. La variable respuesta medida fue el máximo rendimiento fotosintético (ϕ_{po}) usando un fluorómetro de repetición rápida de destellos (FRRF, por sus siglas en inglés). En el primer muestreo se observaron diferencias significativas entre el ϕ_{po} medido en *S. costatum* cultivada en lixiviados y en agua control después de 5 h de exposición. Los resultados correspondientes al segundo muestreo proporcionaron valores significativamente más bajos de ϕ_{po} en los cultivos en agua de M2 comparados con los del control, lo que indica que la fracción soluble del fuel resultó ser la más tóxica.

Palabras clave: bioensayos, almejas, microalga, fuel, *Prestige*.

Abstract

In this study we present the early monitoring of the pollution caused by the accident of the *Prestige* tanker off the Galician coast. To evaluate the toxicity of sediment and water exposed to fuel, three kinds of bioassays were carried out using juvenile clams, clam embryos and microalgae. Firstly, the burrowing behaviour of *Venerupis pullastra* and *Tappes decussatus* in the sediment collected from two beaches of similar characteristics but different pollution conditions, was studied over 24 h. No significant differences were observed between the two sediments. Secondly, embryogenesis success of *Venerupis rhomboideus* was recorded after incubation in seawater and elutriates obtained from affected areas. In this case, fuel-polluted seawater showed a marked inhibition of embryogenesis, while sediment elutriates showed moderate toxicity. Parallel bioassays with the diatom *Skeletonema costatum* were carried out using sediment elutriates and filtered seawater from the sampling sites. The response variable measured was the maximum quantum yield of photosynthesis (ϕ_{po}) using a Fast Repetition Rate Fluorometer (FRRF). In the first sampling, significant differences were found in the response of *S. costatum* cultured in the elutriates as compared to the control after 5 h exposure. The results corresponding to the second sampling showed statistically significant lower values of ϕ_{po} in

the culture incubated in M2 water as compared with the control, indicating that the water-accommodated fraction of fuel at this site was the most toxic.

Key words: bioassay, clams, microalgae, fuel, *Prestige*.

Introducción

El 13 de noviembre de 2002, el petrolero *Prestige* comenzó a derramar fuel pesado muy cerca de la costa de Galicia, dando lugar a lo que, teniendo en cuenta los kilómetros de costa afectados, puede ser uno de los mayores accidentes de este tipo de la historia. Esta región es conocida por su riqueza marisquera y pesquera, con una gran dependencia económica del mar. Entre los bivalvos, tan sólo las almejas (*Venerupis pullastra*, *Tappes decussatus*, *Venerupis rhomboideus*) suman una producción anual de 3162 t. (38×10^6 Euros) (SIP, 2002).

Los bioensayos de laboratorio son una importante herramienta para evaluar la toxicidad de un contaminante en el sedimento. En estos bioensayos se exponen los organismos a muestras de sedimento recogidas en el campo y, tras un tiempo de incubación, se mide su respuesta biológica, que debe ser sensible, ecológicamente relevante y fácil de estandarizar (Stebbing *et al.*, 1980).

La velocidad y el comportamiento de enterramiento de las almejas son respuestas ampliamente empleadas para evaluar la toxicidad del sedimento (DelValls *et al.*, 1998). Por ejemplo, Olla *et al.* (1983) estudiaron el efecto de un sedimento contaminado sobre el comportamiento de enterramiento de *Mercenaria mercenaria*. Por otra parte, el estudio del comportamiento de enterramiento de almejas juveniles en playas afectadas por el vertido proporciona una valiosa información para la regeneración y gestión de las áreas dañadas.

El desarrollo embrionario de bivalvos proporciona una respuesta rápida y sensible a la contaminación marina por hidrocarburos, con valores de EC_{50} alrededor de 1 mg L^{-1} (His *et al.* 1999).

Respecto a los bioensayos con microalgas, el efecto tóxico de los contaminantes provoca una reducción significativa, o la inhibición de la fotosíntesis y el crecimiento algal. Este efecto se ve reflejado en variables como el máximo rendimiento fotosintético (ϕ_{po}), que refleja la eficiencia en la conversión de la energía lumínica en energía química y su posterior uso por los productores primarios. Esta variable proporciona información sobre el estado fisiológico de las algas y además da una respuesta sensible y relevante a la contaminación (Juneau *et al.* 2002).

El objetivo del presente estudio, todavía en curso, es evaluar la toxicidad del agua y sedimento contaminados por fuel sobre organismos representativos del bentos y del plancton.

Material y métodos

Recogida de muestras

Los puntos de muestreo (M1, M2 y M3) fueron elegidos en la costa oeste de Galicia, entre la Ría de Muros y la Ría de

Introduction

The coast of Galicia is characterized by the great economic and social importance of its commercial shellfish catches. Among bivalves, the clams (*Venerupis pullastra*, *Tappes decussatus* and *Venerupis rhomboideus*) have an annual production of 3.162 t (38×10^6 Euros) (SIP, 2002).

Laboratory bioassays are an important tool to evaluate the toxicity of a polluted sediment. In these bioassays, the organisms are exposed to sediment samples collected *in situ* and after the incubation period, a biological response is measured; this response must be sensitive, ecologically relevant and easy to standardize (Stebbing *et al.*, 1980).

The study of burial rates or burrowing behaviour of bivalves has been widely employed to evaluate sediment toxicity (DelValls *et al.*, 1998). For instance, Olla *et al.* (1983) tested the effect of oiled sediment on the burrowing behaviour of *Mercenaria mercenaria*. Moreover, the study of the burrowing behaviour of juvenile clams on affected beaches provides useful information for the management of affected places. Embryonic development of bivalves provides a rapid and sensitive response to hydrocarbon marine pollution, with EC_{50} values around 1 mg L^{-1} (His *et al.* 1999).

The toxic effect of pollutants induces significant reductions or even inhibition of photosynthesis and growth in microalgae. As a consequence, this effect is reflected in variables such as the maximum quantum yield of photosynthesis (ϕ_{po}), the efficiency of light energy conversion into chemical energy and its subsequent use by plants, which gives information on their physiological state and provides a sensitive and ecologically meaningful response to pollution (Juneau *et al.*, 2002).

The aim of the present study is to assess the toxicity of fuel-polluted sediment and seawater on representative benthic and planktonic organisms.

Material and methods

Sampling

Sampling sites (M1, M2 and M3) were selected on the western Galician coast, between Ría de Muros and Ría de Arousa (table 1). On 29 November 2002, M1 and M2 were sampled; M1 had been affected by a large oil spill eleven days before and M2 was still clean. The second sampling was conducted on 17 December 2002, when M1, M2 and M3 were affected. Sediment and water samples were taken and kept refrigerated in plastic bags and bottles, respectively. At each sampling site, three replicates of sediment (upper 4 cm of sediment sampled with a small wooden spade) were collected. Station M3 is a rocky shore and only seawater was sampled. Samples were processed within the following seven days in

Arousa (tabla 1). El 29 de noviembre se hizo un muestreo en M1 y M2. M1 estaba afectada por la primera llegada de fuel desde hacía once días, y M2 estaba todavía limpia. En el segundo muestreo, realizado el 17 de diciembre, los tres puntos de muestreo estaban ya afectados. Las muestras recogidas se conservaron refrigeradas en botellas (agua) y en bolsas de plástico (sedimento). En cada estación de muestreo se cogieron tres muestras de sedimento (tomando los primeros 4 cm del sedimento con una paleta de madera). En la estación M3, sita en un roquedo, sólo se tomaron muestras de agua. Todos los experimentos se realizaron dentro de la semana siguiente a los muestreos, para evitar cualquier cambio en las propiedades químicas de las muestras. Los lixiviados de sedimento se realizaron mezclando sedimento con agua de mar control (1:6 v/v) en botes de plástico cerrados sin aire según Beiras *et al.* (en prensa). El agua de mar control se recogió en un lugar no contaminado, y fue filtrada a través de un filtro de fibra de vidrio Millipore APFF. Después de 30 minutos de mezcla rotatoria, los botes se mantuvieron en oscuridad a 18°C durante toda la noche, para permitir la deposición de toda la materia particulada. La tabla 1 muestra los parámetros físico-químicos medidos en el momento del muestreo. Los análisis químicos del fuel fueron realizados en el Instituto Oceanográfico Español de Vigo (tabla 1).

Bioensayos con almejas

El primer experimento se realizó con *V. pullastra* (10 mm de longitud) y el segundo con *T. decussatus* (de 5–6 mm) procedentes del Instituto Galego de Formación en Acuicultura (I.G.A.F.A.) y del criadero de moluscos Punta Quilma. Los embriones empleados eran de *V. rhomboideus*. El comportamiento de enterramiento fue estudiado por duplicado en vasos

order to avoid any change in their chemical properties. Sediment elutriates were prepared by mixing sediment with control seawater (1:6 v/v) in closed flasks with no air inside (Beiras *et al.*, in press).

Control seawater was taken from a non-polluted site and filtered through Millipore APFF glass fibre filter. After 30 min of rotatory mixing, the flasks were kept in the dark at 18°C overnight to allow settlement of particulate matter. Table 1 shows the values of a series of environmental variables measured at the sampling sites.

Chemical analyses of fuel were carried out at the Instituto Español de Oceanografía of Vigo, Spain (table 1).

Clam bioassays

The first test was carried out with *V. pullastra* (10 mm long) and the second with *T. decussatus* (5–6 mm long), obtained from the Instituto Galego de Formación en Acuicultura and the Punta Quilma clam hatchery. The embryos used belonged to *V. rhomboideus*. The burrowing behaviour was tested in duplicate 1-L beakers filled to 4 cm with sediment and 400 mL of filtered seawater (6:4 sediment:seawater). All beakers were gently aerated and kept at $20 \pm 1^\circ\text{C}$. Ten clams were placed in each beaker. Buried clams were recorded at different times of exposure. A clam was considered buried when no part of the shell was visible.

The median time for burrowing (ET_{50}) was calculated with non-linear regression according to a Michaelis-Menten model: $Y = 100t / (ET_{50} + t)$, where Y was the percentage of buried clams and t was the time in minutes. Differences in burrowing behaviour were compared by using GLM analysis of repeated measurements (Bonferroni test, $P < 0.05$)

Tabla 1. Parámetros físico-químicos del agua y sedimentos tomados en las estaciones de muestreo.

Table 1. Physicochemical variables measured at the sampling sites in sediment and seawater.

		M1-Furnas 42°38'38"N, 9°02'15"W		M2-Vilar 42°33'05"N, 9°01'40"W		M3-Anguiño 42°30'59"N, 9°01'W
		29/11/02	17/12/02	29/11/02	17/12/02	17/12/02
Sedimento	% fino	0.71 ± 0.12		1.54 ± 0.21		
	% MO	0.24 ± 0.05	0.28 ± 0.09	1.11 ± 0.05	0.98 ± 0.08	
	Eh (mv)					
	1 cm	163	225	141	140	
	3 cm	166	223	137	161	
Agua de mar	5 cm	183	229	127	153	
	Tª (°C)	15.5	14.4	15.3	14.2	
	Sal. (ppt)	34.5	29.8	35	33.4	
	pH	7.98	7.8	7.80	7.91	
	DBO ₅ (mg/L)	1.62	1.05	0.93	1.39	1.79
	Fuel (µg/L)	12433.7			272	213

n.m. = no muestreado

de precipitado de 1 L, 4 cm de sedimento y 400 ml de agua de mar filtrada (6:4 sedimento:agua en volumen). Todos los vasos se airearon suavemente y se mantuvieron a una temperatura de $20 \pm 1^\circ\text{C}$. En cada vaso se colocaron 10 almejas. Las almejas enterradas fueron registradas a diferentes tiempos de exposición. Una almeja se consideraba enterrada cuando ninguna parte de su concha era visible.

Se calculó el tiempo medio de enterramiento (ET_{50}) con una regresión no lineal siguiendo el modelo de Michaelis-Menten: $Y = 100t / (ET_{50} + t)$, donde Y era el porcentaje de almejas enterradas y t el tiempo en minutos. Se empleó un Modelo Lineal General (MLG) para medidas repetidas que ofrece análisis de varianza cuando se realiza la misma medida varias veces, en nuestro caso, el enterramiento de las almejas en cada vaso a distintos tiempos (test de Bonferroni, $P < 0.05$).

Bioensayos con embriones

La obtención de gametos tuvo lugar de forma natural como en Beiras y His (1994). Los adultos fueron colocados en tanques de acondicionamiento y, una vez comenzado el desove, se trasladaron a vasos de precipitados individuales; los gametos se observaron al microscopio para seleccionar los huevos de una sola hembra y se usó el esperma de un solo macho para la fecundación, en un probeta y con agitación suave. Después de la fecundación y antes de producirse la primera división, los huevos se introdujeron en viales de polipropileno de 20 mL a una densidad de 20 por mL. En cada experimento se ensayaron cinco réplicas por tratamiento. Los tratamientos consistieron en agua de mar sin diluir, y dos diluciones con agua de mar control: $\frac{1}{2}$ y $\frac{1}{4}$.

Después de 48 h de incubación a 20°C en una cámara isotérmica, los viales se fijaron con unas gotas de formol al 40% y se observaron en un microscopio invertido. La respuesta final registrada fue el porcentaje de larvas D normales, observando una muestra de 100 individuos por vial. Una larva se consideró normal cuando la concha tenía una forma D marcada y el manto no sobresalía de la misma. Por otra parte, los demás individuos se clasificaron en tres clases: larvas-D anormales (sobresale el manto pero tienen forma D); larvas anormales (presentan concha pero no alcanzaron la forma D) y embriones (todavía sin presentar concha).

Se realizó el análisis estadístico con el porcentaje de la variable de larvas normales después de una transformación angular. Se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre tratamientos utilizando un test de Tuckey.

Bioensayos con microalgas

Los lixiviados y el agua recogida se filtraron utilizando filtros Millipore APFF de fibra de vidrio para retirar el microfitobentos y el fitoplancton de las muestras.

Todas las réplicas se inocularon con un cultivo de la diatomea *S. costatum* en crecimiento exponencial, para alcanzar una densidad final de 5000 células mL^{-1} . Las incubaciones se

Embryo bioassays

The gametes were obtained naturally as reported by Beiras and His (1994). After fertilization and before the first cleavage, eggs were transferred into 20-mL polypropylene vials at a density of 20/mL. In each experiment, five replicates were tested per treatment, which consisted of sampled seawater, $\frac{1}{2}$ and $\frac{1}{4}$ dilutions with control seawater. After 48 h incubation at 20°C , vials were fixed with a few drops of 40% formalin and observed under an inverted microscope. The end point recorded was the percentage of normal D-larvae; 100 individuals were checked per vial and classified as follows: normal larvae (when the shell was D-shaped and the mantle did not protrude), abnormal D-larvae (shell was D-shaped but the mantle protruded), abnormal larvae (with shell but not D-shaped) and embryos (no shell).

The percentage of normal larvae was statistically analyzed after an angular transformation. Significant differences ($P < 0.05$) among treatments were tested by using the Tuckey test.

Microalga bioassays

Elutriates and water samples were filtered through Millipore APFF glass-fibre filters in order to remove microphytobenthos and phytoplankton. All the samples were inoculated with a culture of *Skeletonema costatum* growing exponentially to reach a density of 5000 cells mL^{-1} . The incubation was carried out in 2-L Erlenmeyer flasks at 18°C under a 12L:12D photoperiod with bubbling filtered air and adding 1/10 of f/2 culture medium. A Fast Repetition Rate Fluorometer (Chelsea Instruments FAST^{track} titanium FRRF) was configured allowing only the light chamber to flash, where the samples were measured in darkness using an optic glass cuvette. Three subreplicates from each flask were measured after being dark-adapted for 30 min in order to allow relaxation of the variable fluorescence yield (F_v) (the maximum fluorescence yield, F_m , minus the minimal fluorescence yield, F_0). For each subreplicate, $\phi_{po} = F_v/F_m$ was calculated, and then the average for each flask was calculated. Finally, a mean value per treatment was estimated at each exposure time (1, 5, 24 h).

The ϕ_{po} values from the different sampling sites were compared by using ANOVA after checking normality (Saphiro-Wilk test) and homocedasticity (Levene test) using the SPSS statistical package. Whenever significant differences among groups were detected, differences between single groups and the control were tested using the Dunnett *post hoc* test ($P < 0.05$).

Results and discussion

Clam bioassays

Rates of burrowing of the assayed organisms are shown in table 2. The ET_{50} (in minutes) was 13.34 (8.64; 18.04) for

realizaron en Erlenmeyers de 2 L a 18°C bajo un ciclo de luz:oscuridad de 12:12 h. Todos los matraces se airearon con aire filtrado y se les añadieron los nutrientes correspondientes a 1/10 del medio de cultivo f/2 de Guillard. Para medir la variable ϕ_{po} se utilizó un fluorómetro de repetición rápida de destellos (*Fast Repetition Rate Fluorometer*, Chelsea Instruments FAST^{tracka} titanium FRRF), con la cámara clara activada, en la que se midieron las muestras en oscuridad utilizando una cubeta de cristal óptico. Se midieron tres subréplicas de cada matraz tras ser adaptadas a oscuridad durante 30 minutos con el fin de permitir la relajación de la fluorescencia variable (F_v) (la diferencia entre la fluorescencia máxima, F_m , y la fluorescencia mínima F_0). Se calculó para cada subréplica el valor de $\phi_{po} = F_v/F_m$ para, a continuación, calcular la media para cada matraz. Finalmente se estimó un valor medio por tratamiento a los distintos tiempos de exposición: 1, 5 y 24 horas.

Se compararon los valores de ϕ_{po} obtenidos de los distintos puntos de muestreo utilizando un ANOVA, una vez comprobada la normalidad de los datos (test de Saphiro-Wilk) y la homocedasticidad (test de Levene) con el paquete estadístico SPSS. En el caso de encontrar diferencias significativas entre grupos, cada tratamiento se comparó con el control utilizando el test *post hoc* de Dunnett.

Resultados y discusión

Bioensayos con almejas

Las tasas de enterramiento de las almejas se muestran en la tabla 2. No se encontraron diferencias significativas en esta variable entre los tratamientos M1 y M2. Sin embargo, en el segundo experimento, las almejas expuestas al sedimento muestreado en M2 (una playa menos afectada por el vertido que M1) presentaron una ligera tendencia a enterrarse más rápido que las expuestas al otro sedimento. La ET_{50} (en minutos) fue, para M1, 13.34 (8.64; 18.04), y para M2, 8.05 (–1.56; 17.66). Intervalo de confianza del 95% entre paréntesis. Estos valores son similares a los encontrados por DelValls *et al.*, 2002, para sedimentos limpios o moderadamente contaminados. Las diferencias encontradas en la tasa de enterramiento entre experimentos, comparando los porcentajes de almejas enterradas después de 15 minutos de exposición, pueden ser debidas a las diferentes especies o tallas empleadas en ellos.

Respecto a los bioensayos con embriones, se detectó un efecto inhibitorio en el agua procedente de M3, una zona altamente afectada (fig. 1a). El porcentaje de larvas normales después de 48 h de incubación aumentó con el grado de dilución del agua de M3 con agua de mar control.

Por el contrario, el lixiviado obtenido con sedimento procedente de M1 (playa altamente afectada) resultó moderadamente tóxico, y únicamente una de las réplicas redujo la embriogénesis de forma significativa ($P < 0.05$, test de Tuckey) (fig. 1b).

Tabla 2. Valores medios y desviación estándar del porcentaje de enterramiento de las almejas en cada uno de los experimentos y para cada uno de los tiempos de observación.

Table 2. Mean percentages ($\pm$ standard deviation) of buried clams at different time intervals in both experiments.

Tiempo (min)	Exp. 1: 29/11/02		Exp. 2: 17/12/02	
	M1-Furnas	M2-Vilar	M1-Furnas	M2-Vilar
5			10 $\pm$ 10	36 $\pm$ 27.5
10			41.6 $\pm$ 5.7	55 $\pm$ 18
15	93.3	95 $\pm$ 26.4	60 $\pm$ 15	66.6 $\pm$ 20.2
20			65 $\pm$ 13.2	71.6 $\pm$ 17.5
30	98.3 $\pm$ 20.8	98.3 $\pm$ 20.8	71.6 $\pm$ 12.5	80 $\pm$ 15
60	98.3 $\pm$ 20.8	98.3 $\pm$ 20.8	80 $\pm$ 8.6	88.3 $\pm$ 7.6
120	98.3 $\pm$ 20.8	98.3 $\pm$ 20.8	86.6 $\pm$ 12.5	95 $\pm$ 8.6
240	98.3 $\pm$ 20.8	98.3 $\pm$ 20.8	93.3 $\pm$ 5.7	96.6 $\pm$ 5.7
1440	100	98.3 $\pm$ 20.8	96.6 $\pm$ 5.7	98.3 $\pm$ 2.8

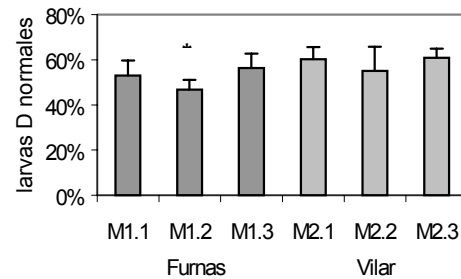
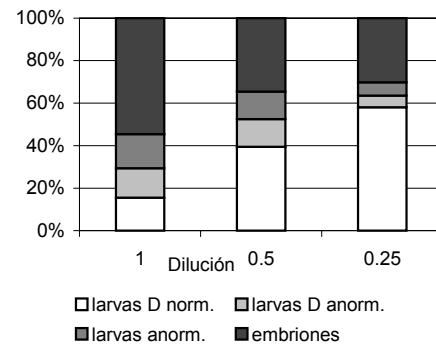


Figura 1. Éxito en la embriogénesis de almeja (a) a distintas diluciones de agua contaminada por fuel de M3. Nótese el aumento en el porcentaje de larvas normales conforme aumenta la dilución del agua problema. (b) Éxito en la embriogénesis de almeja incubada en lixiviados de sedimentos arenosos de dos estaciones: M1 (afectada) y M2 (no afectada).

Figure 1. Embryogenesis success in clam embryos (a) exposed to different dilutions of seawater taken from the fuel-polluted site M3, and (b) exposed to different dilutions of elutriates of sediments sampled at M1 (affected site) and M2 (unaffected site).

Bioensayos con microalga

Los resultados obtenidos del muestreo del 29 de noviembre de 2002 se presentan en la figura 2a, b y c. No se encontraron diferencias significativas ($P = 0.76$) en ϕ_{po} tras una hora de exposición. Sin embargo, después de 5 horas, los valores de ϕ_{po} correspondientes a M1 y M2 fueron significativamente menores que en el control ($P = 0.001$; test de Dunnett, control vs. M1–M2; $P < 0.001$). Las diferencias entre tratamientos desaparecen después de 24 horas ($P = 0.222$).

En la figura 2d, e y f se representan los resultados correspondientes al segundo muestreo. En este caso se detectaron diferencias significativas en el matraz con agua procedente de M2 (M2a) después de 1 hora de exposición ($P < 0.001$; test de Dunnett). Esta diferencia se mantuvo a lo largo de todo el experimento, no detectándose actividad fotosintética después de 5 horas. Tras una comprobación del estado del cultivo al

M1 and 8.05 (–1.56; 17.66) for M2; the confidence interval at 95% is given in parentheses. These ET_{50} values are similar to those found by DelValls *et al.* (2002) for clean or moderately polluted sediments. No significant differences in buried rates between M1 and M2 were found, although in the second test, clams exposed to M2 sediment (a beach less affected than M1) showed a slight trend to bury faster than those exposed to M1 sediment. Differences in burial rates among experiments, comparing percentages of buried clams after 15 min of exposure, could be due to differences in species and individual size between experiments.

In embryo bioassays, the inhibitory effect of seawater sampled at M3, a highly affected area, on embryogenesis is clearly illustrated in figure 1a. The percentage of normal larvae after a 48-h incubation period increased with dilution of M3 water in control seawater. By contrast, the elutriate

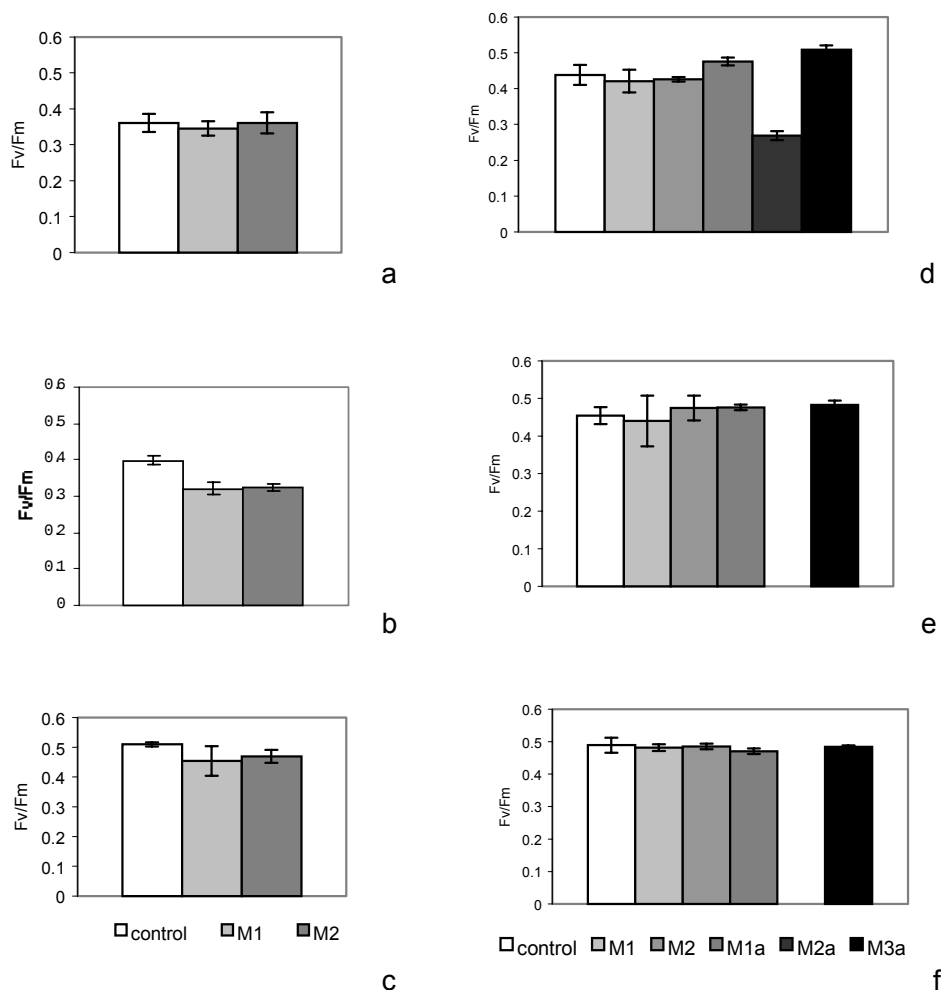


Figura 2. Valores de ϕ_{po} medidos en lixiviados de sedimentos de M1 y M2 del 29 de Noviembre de 2002. (a) 1 h de incubación; (b) 5 h de incubación; (c) 24 h de incubación; y en lixiviados de sedimentos de M1 y M2, y agua de M1, M2 y M3, del 17 de Diciembre de 2002. 4: 1 h de incubación; 5: 5 h de incubación; 6: 24 h de incubación.

Figure 2. Maximum quantum yield of photosynthesis (ϕ_{po}) measured in control and sediment elutriates (M1, M2) on November 29th 2002: (a) 1h exposure; (b) 5h exposure; (c) 24h exposure. ϕ_{po} measured in control, sediment elutriates (M1, M2) and seawater (M1a, M2a, M3a) on 17th December 2002: (d) 1h exposure; (e) 5h exposure; (f) 24h exposure.

microscopio, no se encontró ninguna célula en M2a, mientras M1a y M3a presentaban una densidad celular media de 40,000 células mL⁻¹ después de 5 días de incubación.

En el momento del primer muestreo, M1 ya estaba afectada por la marea negra, mientras que M2 parecía aparentemente limpia. Después de 5 horas de exposición, los valores de ϕ_{po} medidos en ambos lixiviados eran significativamente menores que los registrados en el control (fig. 2b), lo que puede sugerir que M2 también estaba afectada. Esta diferencia también puede atribuirse al hecho de que la microalga se cultivó en lixiviados, donde la concentración de sustancias disueltas y bacterias es mayor que en el agua usada como control. Esta posibilidad es consistente con la ausencia de diferencias significativas en ϕ_{po} entre M1 y M2, pero no concuerda con los resultados obtenidos en el segundo muestreo (fig. 2d, e y f), donde no se encontraron diferencias significativas entre el control y los lixiviados a lo largo del experimento. En este caso, todos los puntos de muestreo estaban afectados por el vertido de fuel y las playas habían sido objeto de limpieza manual.

Respecto al agua de mar recogida, ϕ_{po} medido en las muestras tomadas en M2 (M2a) tras 1 h, fue significativamente menor que en los otros tratamientos, y no se registró actividad fotosintética después de 5 h de exposición (fig. 2e). Este hecho se debe a la muerte del cultivo, puesto que tras 5 días de incubación no se encontró ninguna célula mediante la observación al microscopio. Estos efectos no se encontraron en el lixiviado correspondiente a este punto, lo que nos puede indicar que el agente tóxico del fuel para las microalgas radica en la fracción soluble.

Es conveniente la realización de más experimentos para confirmar lo encontrado en estos primeros estudios. Se está llevando a cabo un seguimiento de la contaminación cada 15 días, con el mismo esquema de muestreo utilizado el 17 de diciembre de 2002 pero aumentando la replicación.

Conclusión

Los resultados muestran que los sedimentos procedentes de playas moderadamente afectadas no inhiben la actividad de enterramiento en almejas juveniles. Este resultado conlleva implicaciones interesantes desde el punto de vista de la gestión de la repoblación en estas zonas, debido a que se podría considerar la siembra de las playas afectadas con juveniles de almejas. De todos modos, se deben realizar previamente experimentos de crecimiento a largo plazo.

Aunque se encontraron abundantes bolas de chapapote en estas zonas, los lixiviados no presentaron alta toxicidad. Esto indica que la toxicidad aguda del fuel envejecido, rico en compuestos de alto peso molecular, es relativamente baja para los organismos empleados en los bioensayos. Por el contrario, el agua recogida en una zona afectada (M3, con elevado hidrodinamismo) sí mostró toxicidad importante en los embriones. Estos resultados deben de ser contrastados con estudios ecotoxicológicos futuros, prestando especial atención a la fracción soluble del fuel. También se debe completar con una batería de tests de toxicidad de sedimento y agua de mar.

obtained from M1 (highly affected) was moderately toxic, and only one of the replicates significantly inhibited embryogenesis ($P < 0.05$, Tuckey test) (fig. 1b).

Microalga bioassays

The results corresponding to the sampling on 29 November 2002 are shown in figure 2. No significant differences ($P = 0.76$) in ϕ_{po} were found after 1 h of exposure (fig. 2a). However, after 5 h, ϕ_{po} values for M1 and M2 were significantly lower than control values (fig. 2b) ($P = 0.001$; Dunnett test, control vs M1–M2: $P < 0.001$). After 24 h, the differences between treatments no longer existed ($P = 0.222$) (fig. 2c).

In the second sampling, significant differences were detected in the water collected from station M2 (M2a) after the first hour of exposure ($P < 0.001$; Dunnett test) (fig. 2d). These differences remained throughout the experiment, showing no photosynthetic activity after 5 h exposure (fig. 2e). Microscopic examination of M2a culture did not show the presence of any cell, whereas M1a and M3a showed a mean cell density of 40,000 cells mL⁻¹ after five days of incubation.

By the date of the first sampling, M1 was already affected by the oil spill, whereas M2 was apparently clean. After 5 h exposure, ϕ_{po} measured in the elutriates from M2 and M1 were significantly lower than in the control (fig. 2a, b, c), which suggests that M2 was also affected. The decrease in ϕ_{po} could also be attributed to the fact that cells were cultured in elutriates, where the concentration of dissolved substances and bacteria are higher than in the seawater used as control. This possibility is consistent with the lack of significant differences in ϕ_{po} between M1 and M2, but contrasts with the results obtained in the second sampling, where no differences were found between control and elutriates throughout the experiment. In this case, all sampling sites had been affected by the fuel spill, but beaches had undergone manual cleaning activities.

For M2 seawater samples (M2a), ϕ_{po} after 1 h was significantly lower than for the other treatments, and after 5 h exposure no photosynthetic activity could be measured, which agrees with the value of 0 cells/mL measured five days later in that treatment. Since these effects were not found in the elutriate obtained from this sampling site, it can be envisaged that the toxicity is related to the water-accommodated fraction of the fuel.

Further experimental work is needed to confirm the trends found in this early toxicity assessment. The evolution of the impact in these sites is being studied fortnightly following the sampling scheme used on 17 December 2002, but with larger replication.

Conclusion

The results proved that pollution levels of sediments taken from moderately affected beaches, after cleaning activities, did not inhibit the burrowing behaviour in juvenile clams. This

Agradecimientos

Los autores de este trabajo quisieran agradecer a Iván Alonso y Verónica Benítez su ayuda en la toma de muestras, y a Sandra Ares, María Espiñeira, Kostka Fernández y Marcos Íñigo Pérez su ayuda técnica en el laboratorio. Las almejas fueron proporcionadas desinteresadamente por el criadero de Punta Quilma y el Instituto Galego de Formación en Acuicultura (I.G.A.F.A.)

Referencias

- Beiras, R. and His, E. (1994). Effects of dissolved mercury on embryogenesis survival, growth and metamorphosis of *Crassostrea gigas* oyster larvae. Mar. Ecol. Prog. Ser., 113: 95–103.
- Beiras, R., Fernández, N., Bellas, J., Besada, V., González-Quijano, A. and Nunes, T. (2003). Integrative assessment of marine pollution in Galician estuaries using sediment chemistry, mussel bioaccumulation, and embryo-larval toxicity bioassays. Chemosphere (in press).
- Byrne, P.A. and O'Halloran, J. (1999) Aspects of assaying sediment toxicity in Irish estuarine ecosystems. Mar. Pollut. Bull., 39 (1–12): 97–105.
- DelValls, T.A., Forja, J.M. and Gómez-Parra, A. (1998). Integrative assessment of sediment quality in two littoral ecosystems from the Gulf of Cádiz, Spain. Environ. Toxicol. Chem., 17(6): 1073–1084.
- DelValls, T., Forja, J.M. and Gómez-Parra, A. (2002). Seasonality of contamination, toxicity, and quality values in sediments from littoral ecosystems in the Gulf of Cádiz (SW Spain). Chemosphere, 46: 1033–1043.
- His, E., Beiras, R. and Seaman, M.N.L. (1999). The assessment of marine pollution: Bioassays with bivalve embryos and larvae. A.I. Southerward, P.A. Tyler and C.M. Young (eds.), Advances in Marine Biology. Vol. 37. Academic Press, London, 178 pp.
- Juneau, P., El Berdey, A. and Popovic, R. (2002). PAM fluorometry in the determination of the sensitivity of *Chlorella vulgaris*, result has important implications for the management of the recovery plan in these areas, since seeding the affected beaches with juvenile clams can be contemplated. However, long-term growth experiments should be carried out.
- Although many small-size tar balls were found buried in this area, the elutriates did not show high toxicity. This indicates that the acute toxicity of this weathered fuel, very rich in high molecular weight compounds, is relatively low for the organisms tested; occasionally, the water from affected areas did show marked toxicity on embryos and algae. These result, either positive or negative, should be checked in following ecotoxicological studies, paying special attention to the water-accommodated fraction of the fuel. A battery of sediment and seawater toxicity tests must be included.

Acknowledgements

The authors would like to express their thanks to Iván Alonso and Verónica Benítez for their help in the field work, and to Sandra Ares, María Espiñeira, Kostka Fernández and Marcos Íñigo Pérez for their technical assistance. The clams were kindly provided by the Punta Quilma hatchery and the Instituto Galego de Formación en Acuicultura.

English translation by the authors.

-
- Selenastrum capricornutum* and *Chlamydomonas reinhardtii* to copper. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 42: 155–164.
- Olla, B.L., Bejda, A.J. and Pearson, W.H. (1983). Effects of oiled sediment on the burrowing behavior of the hard clam, *Mercenaria mercenaria*. Mar. Environ. Res., 9: 183–193.
- Stebbing, A.R.D., Akesson, B., Calabresse, A., Gentile, J.H., Jensen, A. and Lloyd, R. (1980). The role of bioassays in marine pollution monitoring. Bioassay Panel Rep., Rapp. P.-V. Reun. Cons. Int. Explor. Mer, 179: 322–332.